Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

UNTERSUCHUNGEN ZUR „CLUSTERGRÖSSE" DER SPÄTEN PRÄLEPTOTÄNEN I-SPERMATOCYTEN DES MENSCHEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Schare

1978

Aus dem Institut für Hygiene der Universität Düsseldorf
und dem Medizinischen Institut für Lufthygiene und
Silikoseforschung an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentelle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

UNTERSUCHUNGEN ZUR "CLUSTERGRÖSSE" DER SPÄTEN PRÄ-LEPTOTÄNEN I-SPERMATOCYTEN DES MENSCHEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
MICHAEL SCHARE

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Meditinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.:Prof. Dr. med.
W.Hilscher

Korreferent
gez.:Prof. Dr. med.
Hofmann

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Einleitung	1
Material und Methodik	3
Resultate	7
Diskussion	11
Zusammenfassung	13
Literatur	16

E I N L E I T U N G [x]

Die vorliegende Arbeit wurde anhand einer von Herrn Professor Holstein (Anatomisches Institut der Universität Hamburg) zur Verfügung gestellten lückenlosen Serie von 250 Semidünnschnitten erstellt. An dieser Schnittserie hatte bereits Kamman (1978) Untersuchungen der A dark Spermatogonien durchgeführt und vor allem den prozentualen Anteil der zu verschiedenen Kollektiven zusammengefaßten Zellen dieses Typs bestimmt. Diesen Bestimmungen lag die bekannte Tatsache zugrunde, daß die Geschlechtszellen zwar häufig einzeln vorkommen, vielfach aber auch in Form "synchronosierter Gruppen".

Wie Dym und Fawcett (1971) sowie Wartenberg (1974, 1976) beschreiben, sind viele gleich alte Geschlechtszellen durch Zellbrücken miteinander verbunden und bilden so die synchronosierten Zellgruppen, welche in der Literatur als "synchronized clusters" bezeichnet werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, wie groß der Prozentsatz der einzeln und in Gruppen vorkommenden späten präleptotänen I-Spermatocyten (Abb. 1 und 2) an der Gesamtzahl dieses

[x] mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungs-Gesellschaft

Geschlechtszelltyps war.Wie in der Arbeit von Kamman (1978) wurden die in Gruppen vorkommenden Geschlechtszellen zu Kollektiven unterschiedlicher "Clustergröße" zusammengefaßt.
Wie aus Abb. 1 und 2 zu ersehen ist,stellen die späten präleptotänen I-Spermatocyten die Tochterzellen der letzten Spermatogoniengeneration dar,der sogenannten B-Spermatogonien,die früher "Krustenspermatogonien" genannt wurden.

M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

Das von Herrn Prof. Dr. A. F. Holstein (Anat. Institut der Universität Hamburg) zur Verfügung gestellte Material stammte von einem 47 Jahre alten Mann, der wegen wiederholter Sittlichkeitsdelikte bestraft werden sollte und sich vor seinem Verfahren freiwillig einer Kastration unterzog. Das Gewebe war lebensfrisch, unmittelbar nach der Entnahme, in kleinen Stückchen mit einer Kantenlänge von ca. 1 mm nach folgender Vorschrift fixiert, entwässert und in den Kunststoff Epon 812 eingebettet worden:

I. Fixierung in:	Verweildauer:
6% Glutaraldehyd (SCHUCHARDT, München)	30 '
in Phosphatpuffer (eisgekühlt)	
Gemisch: Phosphatpuffer (0,2m)	1 Teil
Glutaraldehyd (24%)	1 Teil
Aqua bidest.	2 Teile

Anschließend:

1% OsO_4 in Phosphatpuffer (unter dem Abzug)	2 h

Gemisch:

2% OsO_4	1 Teil
0,2m Puffer-Saccharose-Gemisch	1 Teil

(100 ml Puffer + 6,846 g Saccharose)

II. Entwässerung in:

35% Alkohol bei 4° C	10-15 '
50% Alkohol bei 4° C	10-15 '
70% Alkohol bei 4° C	10-15 '
96% Alkohol bei 4° C	10-15 '
100% Alkohol bei Zimmertemperatur	10-15 '
100% Alkohol bei Zimmertemperatur	10-15 '
Propylenoxid bei Zimmertemperatur	15 '
Propylenoxid bei Zimmertemperatur	15 '

III. Einbettung in:

a)	fertige Eponmischung	1 Teil	1 h
	Propylenoxid	mischen unter dem Abzug!	
b)	fertige Eponmischung	3 Teile	12 h
	Propylenoxid	1 Teil	mischen unter dem Abzug!

c) fertige Eponmischung in flachen Schälchen

polymerisieren bei 37° C	5 - 10 h
polymerisieren bei 45° C	12 h
polymerisieren bei 60° C	12 - 16 h

Diese Vorschrift für die Einbettung in Epon gründet sich auf das von Luft (1961) angegebene Verfahren und wurde von Wartenberg (1966) und den Mitarbeitern des Anatomischen Instituts der Universität

Hamburg modifiziert. Aus den auf diese Weise gewonnenen Kunststoffblöcken werden die eingebetteten Gewebsstückchen ausgesägt und mit Uhu-plus auf einen Aluminiumzylinder geklebt.

Von diesen Präparaten wurden mit einem Ultramikrotom 1 u dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf einer kleinen Wasserfläche aufgefangen, die bis an die Schneidekante des Glasmessers reichte. Von hier aus konnten sie mit einer Platinöse zusammen mit einem kleinen Wassertropfen in ein Blockschälchen, in dem sich die Färbeflüssigkeit befand, übertragen werden. Bei der Färbung schwammen die Schnitte auf folgender Lösung:

A = 1% Toluidinblau in 1%iger Boraxlösung

B = 1% Pyroninlösung

Mischungsverhältnis: A : B = 4 : 1

Die Färbedauer betrug auf einer Heizplatte bei 80° C je nach Gewebe etwa 5 Minuten. Überschüssige Farbstoffmengen lassen sich durch Übertragen der Schnitte in 3 Schälchen mit Aqua bidest. entfernen. Die Schnitte wurden dann auf einen auf der Heizplatte liegenden Objektträger übertragen und nach Absaugen des Wassertropfens mittels eines Fließpapiers aufgetrocknet. Ein kleiner Tropfen zähflüssigen Caedax wurde auf ein

Deckgläschen gebracht und dieses so auf den heißen Objektträger gelegt,daß das Caedax zwischen Objektträger und Deckglas floß.

Von einem der hergestellten Blöcke wurden 250 Serienschnitte angefertigt,die uns zur Auswertung übergeben wurden.

Die Identifizierung der späten präleptotänen I-Spermatocyten erfolgte an 14 Kanälchenabschnitten,welche über sämtliche 250 Serienschnitte verfolgt werden konnten.Von jedem Serienschnitt lag eine Übersichtsaufnahme vor,in denen die auszuwertenden Kanälchenabschnitte kenntlich gemacht waren.Von diesen Kanälchen wurden etwa 3000 Einzelaufnahmen angefertigt, in denen die Geschlechtszellen deutlich zu erkennen waren.

Diese Aufnahmen lagen während der Identifizierung der späten präleptotänen I-Spermatocyten unter dem Mikroskop vor.Da die Serie lückenlos war,gelang es,festzustellen,ob die unter dem Mikroskop identifizierten und in den Kanälchenabschnitten kenntlich gemachten und numerierten späten präleptotänen I-Spermatocyten einzeln oder in Form von Clustern vorlagen.

R E S U L T A T E

Die späten präleptotänen I-Spermatocyten wurden zu insgesamt 9 Kollektiven zusammengefaßt.
Es setzten sich zusammen

Kollektiv I
aus den einzeln auftretenden späten präleptotänen I-Spermatocyten, die als "Einercluster" bezeichnet werden, obwohl ein echter "Cluster" nicht vorliegt,

Kollektiv II
aus den zu Zweierclustern formierten späten präleptotänen I-Spermatocyten,

Kollektiv III
aus Clustern mit 3 und 4 späten präleptotänen I-Spermatocyten,

Kollektiv IV
aus Clustern mit 5 - 8 späten präleptotänen I-Spermatocyten,

Kollektiv V
aus Clustern mit 9 - 16 späten präleptotänen I-Spermatocyten,

Kollektiv VI
aus Clustern mit 17 - 32 späten präleptotänen I-Spermatocyten,

Kollektiv VII
aus Clustern mit 33 - 64 späten präleptotänen I-Spermatocyten,

Kollektiv VIII
aus Clustern mit 65 - 128 späten präleptotänen I-Spermatocyten,

Kollektiv IX
aus Clustern mit 129 - 256 späten präleptotänen I-Spermatocyten.

Der prozentuale Anteil an der Gesamtzahl der erfaßten Cluster (einschließlich der "Einercluster") von späten präleptotänen I-Spermatocyten und die absolute Anzahl der Cluster sowie ihre Zuordnung

zu den Kollektiven I - IX ist aus Tabelle 1 zu ersehen, der prozentuale Anteil der Geschlechtszellen an der Gesamtzahl der späten präleptotänen I-Spermatocyten sowie ihre absolute Zellzahl pro Kollektiv aus Tabelle 2. Die prozentualen Anteile der späten präleptotänen I-Spermatocyten pro Kollektiv gibt Figur I wieder.

Tabelle 1

		abs. Clusterzahl
Kollektiv I	5,35 %	3
Kollektiv II	25,00 %	14
Kollektiv III	23,21 %	13
Kollektiv IV	14,29 %	8
Kollektiv V	14,29 %	8
Kollektiv VI	7,14 %	4
Kollektiv VII	7,14 %	4
Kollektiv VIII	1,79 %	1
Kollektiv IX	1,79 %	1

Tabelle 2

		abs. Zellzahl
Kollektiv I	0,39 %	3
Kollektiv II	3,68 %	28
Kollektiv III	5,79 %	44
Kollektiv IV	6,31 %	48
Kollektiv V	11,18 %	85
Kollektiv VI	13,81 %	105
Kollektiv VII	18,98 %	144
Kollektiv VIII	15,13 %	115
Kollektiv IX	24,73 %	188

D I S K U S S I O N

Der Prozentsatz der "Einercluster" - welche jeweils aus nur einer späten präleptotänen I-Spermatocyte bestehen - an der Gesamtzahl aller Cluster beträgt etwa 5,35%.
Im Gegensatz zu den Befunde von Kamman (1978), der fand,daß bei den A dark Spermatogonien die "Einercluster" das größte Cluster-Kollektiv darstellten und darüber hinaus mehr A dark Spermatogonien enthielten als eines der anderen Kollektive,ist der prozentuale Anteil des Cluster-Kollektivs I an der Gesamtzahl aller Cluster nur etwa 5,35%.
Wie Kamman (1978) ausführte,kommt als Ursache für das Auftreten einzelner Geschlechtszellen möglicherweise in Betracht,daß in diesen Fällen der Zusammenhang mit dem zugehörigen Cluster während der letzten Mitose durch Lösung der interzellulären Zellbrücken verlorenging oder daß ein oder mehrere "Clusterpartner" zugrunde gegangen sind.
Folgt man dieser Interpretation,so könnte man zunächst zu dem Schluß gelangen,die späten präleptotänen I-Spermatocyten würden eine wesentlich geringere Tendenz besitzen,sich nach ihrer Entstehung (durch die Teilung ihrer Mutterzellen,

der B-Spermatogonien) voneinander zu trennen. Bei einem Vergleich der Clusteranzahl und auch der Clustergröße von A dark Spermatogonien und späten präleptotänen I-Spermatocyten muß aber davon ausgegangen werden,daß die A dark Spermatogonien mehrere Teilungen vor den späten präleptotänen I-Spermatocyten entstanden sind,mithin einen anderen "Stellenwert" im Ablauf der Spermatogenese besitzen.Bei gleich hoher Wahrscheinlichkeit einer Trennung nach der Mitose oder vorangegangenem Zelluntergang eines oder mehrerer "Clusterpartner" haben mithin auch die "Einercluster" der A dark Spermatogonien einen anderen "Stellenwert" als jene der späten präleptotänen I-Spermatocyten.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wird über Untersuchungen an einer lückenlosen Serie von 250 Semidünnschnitten aus einem menschlichen Testis eines 47 Jahre alten Probanden berichtet. Das aufgeschnittene und gefärbte Untersuchungsmaterial wurde von Prof. Holstein, Hamburg, zur Verfügung gestellt. Gegenstand der Untersuchungen war die "Clustergröße" der späten präleptotänen I-Spermatocyten. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, daß Kamman (1978) in derselben Serie Untersuchungen zur "Clustergröße" der A dark Spermatogonien durchführte.
Um die "Clustergröße" der späten präleptotänen I-Spermatocyten zu bestimmen wurde zur Dokumentation zunächst von jedem der 250 Semidünnschnitte eine Übersichtsaufnahme angefertigt, in der die auszuwertenden Kanälchenabschnitte durch farbliche Einrahmung gekennzeichnet wurden. Sodann wurden Einzelaufnahmen dieser Kanälchenabschnitte erstellt, in denen die Geschlechtszellen deutlich zu erkennen waren.
Die in Gruppen vorkommenden Geschlechtszellen wurden zu 9 Kollektiven unterschiedlicher "Clustergröße"

zusammengefaßt.Kollektiv I enthielt nur einzelne späte präleptotäne I-Spermatocyten ("Einercluster"), Kollektiv II zwei späte präleptotäne I-Spermatocyten usw.,Kollektiv IX umfaßte Cluster in der Größenordnung von 129 - 256 Geschlechtszellen. Tabelle 1 gibt die Clusterzahl und ihren prozentualen Anteil pro Kollektiv wieder,Tabelle 2 die Zellzahl und ihren prozentualen Anteil pro Kollektiv.

Figur I zeigt die Häufigkeitsverteilung der späten präleptotänen I-Spermatocyten pro Kollektiv.

Der prozentuale Anteil der "Einercluster" beträgt nur 5,35%,während bei den A dark Spermatogonien die "Einercluster" den größten Anteil aller Kollektive darstellten, (Kamman,1978).

Bei den späten präleptotänen I-Spermatocyten enthält das Kollektiv II (2 - 4 Geschlechtszellen) die meisten Cluster (25%),während Kollektiv IX (1,79%) mit 188 Geschlechtszellen pro Cluster die meisten Zellen umfaßt.

Bei einem Vergleich der Clusteranzahl und auch der Clustergröße von A dark Spermatogonien und späten präleptotänen I-Spermatocyten muß angenommen werden,

daß die A dark Spermatogonien mehrere Teilungen vor den späten präleptotänen I-Spermatocyten entstanden sind. Sie besitzen somit einen anderen "Stellenwert" im Ablauf der Spermatogenese.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Dym, M. and D. W. Fawcett: Further observations on the numbers of spermatogonia,spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis.Biology of Reproduction 4, 195 - 215 (1971)

Kamman, A.: Untersuchungen zur "Clustergröße" der A dark Spermatogonien des Menschen.(1978)

Wartenberg, H.: Spermatogenese - Oogenese:ein cyto-morphologischer Vergleich.Verh. Anat. Ges. 68,63 - 92 (1974)

Wartenberg, H.: Comparative Cytomorphological Aspects of the Male Germ Cells,Especially of the "Gonia".Andrologia 8 (2):117 - 130 (1976)

%
25
20
15
10
5
Häufigkeitsverteilung der
späten Präleptotänen
Figur 1
10^0
2
5
10^1
2
5
10^2
2
5
Zellen/Cluster

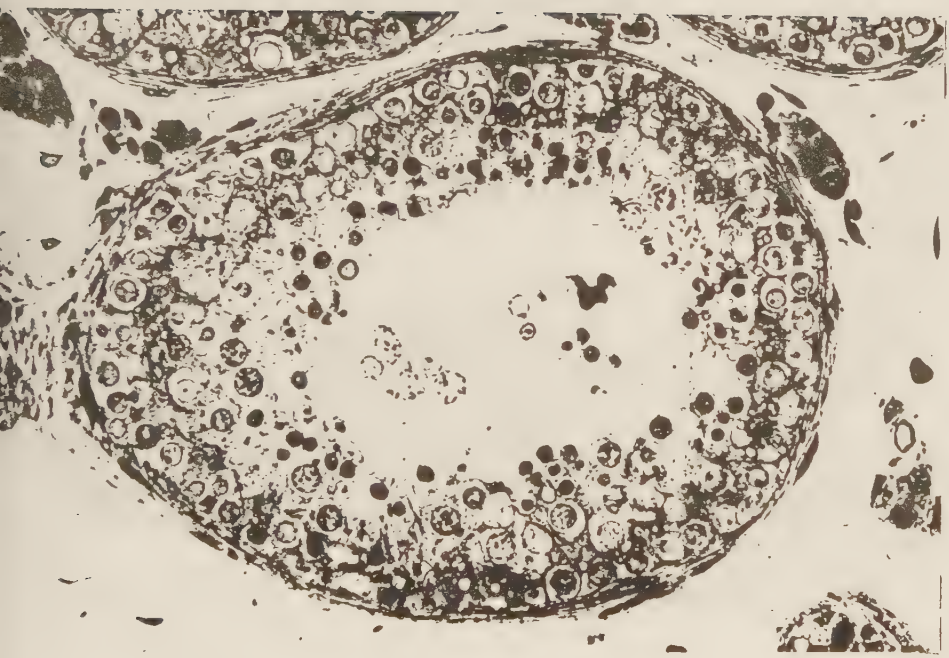

Abbildung 1

Abbildung 2

Schema 1

Von Clermont (1966) vermuteter Proliferationsmodus des menschlichen Samenepithels.

A_1 = A dark Spermatogonien,

A_2 = A pale Spermatogonien,

Pl = präleptotäne I-Spermatocyten

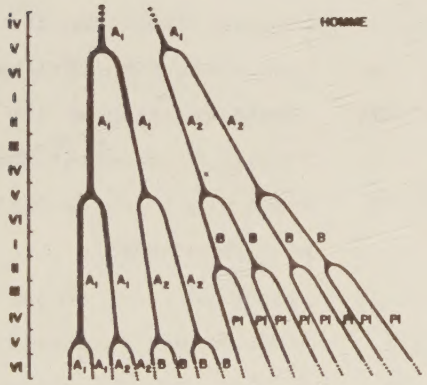

Fig. 22.

Schéma illustrant le mode de renouvellement des spermatogonies chez l'homme. (Emprunté à Clermont, Y., 1966, *Am. J. Anat.*, *118*, 509-524.)

L E B E N S L A U F

6.8.51	Geboren in Bremerhaven
	Vater: Diplomvolkswirt Dr. K. Schare
	Mutter: Edith Schare, geb. Lische
3.11.51	Tödlicher Autounfall meines Vaters
Ostern 58	Aufnahme in die Hermann-Löns-Schule in Bremerhaven
Ostern 62	Aufnahme in das Geschw.-Scholl-Gymn. in Düsseldorf
15.7.-	Krankenpflege-Praktikum an den Uni-
15.9.70	Kliniken Düsseldorf
8.10.70	Immatrikulation an der Uni Köln
	Math.-Nat. Fakultät: Physik
2.11.71	Immatrikulation an der Uni Bochum
	Math.-Nat. Fakultät: Chemie
15.4.72	Immatrikulation FU Berlin
	Fach Humanmedizin
15.10.72	Immatrikulation an der Uni Düsseldorf
1.3.73	Bestehen des Vorphysikums
3.4.74	Bestehen des Physikums
25.3.75	Bestehen des Ersten Teils des Staatsexamens
31.3.77	Bestehen des zweiten Teils des Staats- examens
ab 1. 4.77	Absolvierung des Praktischen Jahres